

PROTEIN INHIBITING HUMAN CHK2-PHOSPHORYLASE ACTIVITY

Publication number: JP2001346588 (A)

Publication date: 2001-12-18

Inventor(s): OGAWA AKIRA; NAKAMURA AYAKO +

Applicant(s): IGAKU SEIBUTSUGAKU KENKYUSHO K +

Classification:

- international: **A61K38/55; A61P43/00; C07K14/47; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/10; C12P21/02; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/566; C12R1/19; A61K38/55; A61P43/00; C07K14/435; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/10; C12P21/02; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/566; (IPC1-7): A61K38/55; A61P43/00; C07K14/47; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/10; C12P21/02; C12R1/19; C12R1/19; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/566**

- European:

Application number: JP20000172273 20000608

Priority number(s): JP20000172273 20000608

Abstract of **JP 2001346588 (A)**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a protein inhibiting a human Chk2-phosphorylase activity and a DNA encoding the protein. **SOLUTION:** This protein is an isolated Chk2 (del; 337-365) protein having the amino acid sequence represented by a sequence 2 in the specification, and the other objective DNA isolated is Chk2 (del; 337-365) DNA that encodes the protein and has the base sequence represented by a sequence 1 in the specification.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-346588
(P2001-346588A)

(43) 公開日 平成13年12月18日 (2001. 12. 18)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード* (参考) |
|--------------------------------------|-------|---------------|-----------------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1 2 G 0 4 i |
| A 6 1 K 38/55 | | C 0 7 K 14/47 | 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 P 43/00 | 1 1 1 | C 1 2 N 1/15 | 4 B 0 6 4 |
| C 0 7 K 14/47 | | 1/19 | 4 B 0 6 i |
| C 1 2 N 1/15 | | 1/21 | 4 C 0 8 4 |
| 審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 36 頁) 最終頁に続く | | | |

(21) 出願番号 特願2000-172273(P2000-172273)

(22) 出願日 平成12年6月8日(2000. 6. 8)

(71) 出願人 390004097

株式会社医学生物学研究所
愛知県名古屋市中央区丸の内3丁目5番10号
住友商事丸の内ビル5F

(72) 発明者 小川 晃

長野県伊那市大字手良沢岡字大原1063-
103 株式会社医学生物学研究所内

(72) 発明者 中村 あや子

愛知県名古屋市中央区丸の内3丁目5番10号
住友商事丸の内ビル5階 株式会社医学
生物学研究所内

(74) 代理人 100062007

弁理士 川口 義雄 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトC h k 2リン酸化酵素活性を阻害するタンパク質

(57) 【要約】

【課題】 ヒトC h k 2リン酸化酵素活性を阻害するタンパク質、該タンパク質をコードするDNAを提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明により、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するヒトC h k 2リン酸化酵素活性を阻害するC h k 2 (del ; 337-365) タンパク質、および該タンパク質をコードする配列番号1に示される塩基配列を有するC h k 2 (del ; 337-365) DNAが単離される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)に示すDNAからなる遺伝子。

(a) 配列表の配列番号1に示す塩基配列からなるDNA。

(b) 配列表の配列番号1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヒトChk2リン酸化酵素活性を阻害するタンパク質をコードするDNA。

【請求項2】 以下の(a)又は(b)に示すタンパク質。

(a) 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

(b) 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトChk2リン酸化酵素活性を阻害するタンパク質。

【請求項3】 請求項1に記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項4】 請求項3に記載のベクターを含む形質転換体。

【請求項5】 請求項2に記載のタンパク質をヒトChk2リン酸化酵素活性阻害剤として使用する方法。

【請求項6】 請求項1に記載のDNAまたは請求項2に記載のタンパク質をChk2リン酸化酵素阻害剤開発のリード分子として使用する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、Chk2リン酸化酵素活性を阻害するタンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該DNAを含有するベクター、該ベクターを含む形質転換体、該タンパク質をChk2阻害剤として使用する方法および該タンパク質または該タンパク質のcDNAをChk2阻害剤開発のリード分子として使用する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】細胞は増殖に際してそのゲノムDNAを複製し、二つの娘細胞へ均等に分配した後分裂するという過程を周期的に繰り返す。このような一連の周期は細胞周期と呼ばれている。細胞周期はG1期(DNA合成準備期; G1=gap1)、S期(DNA合成期; S=synthesis)、G2期(分裂準備期; G2=gap2)、M期(分裂期; M=mitotic)に分けることができ、各段階を順番に経て細胞は分裂をし、増殖する。またG1期の細胞でDNA複製がすすまない場合には、周期の進行が停止してG0期(休止期)とよばれる状態に入る。

【0003】化学的・物理的刺激に起因した細胞周期進行の阻止という現象は、細胞周期異常を伴う変異体(mutant)の遺伝学的解析と同様に、細胞周期の制御・調節機構を理解する上で重要な知見を与えてきた。リボヌクレオチドリダクターゼの阻害剤として作用するヒドロキ

シウレア(S期阻害)、チューブリン重合阻害をおこすコルセミド(M期阻害)、HMG-CoA還元酵素阻害剤のロバスタチン(G1期)、Cdk阻害剤のブチロラクトンI(G1期、G2期阻害)などの化合物をその例として挙げる事ができる。これらの細胞周期阻害剤は抗がん剤としての開発経緯を持つが、逆に細胞周期調節・制御を担う分子を標的とした阻害剤が抗がん剤となりうることを予想させる。

【0004】紫外線照射、電離放射線照射、薬剤などによりDNA損傷を受けると、その損傷を修復するために、哺乳動物細胞は通常G1期、S期またはG2/M期で停止する。この現象は細胞周期チェックポイントと呼ばれ、その情報伝達については次のようなことが明らかにされつつある。DNA損傷にตอบสนองしてp53は転写活性化され、p21CIP1/WAF1や14-3-3σを発現誘導する[S.J.Elledge(1996) Science Vol274, p1664; P.Nurse(1997) Cell Vol 91, p865]。p21CIP1/WAF1はG1期の進行に必要なCyclin E-Cdk2, Cyclin D-Cdk4, 6と結合してそのタンパク質リン酸化酵素としての活性を阻害する[S.J.Elledge(1996) Science Vol274, p1664; D.O.Morgan (1995) Nature Vol 374, p131]。そのためG1期阻止が達成されると理解されている。一方、細胞周期チェックポイントに関与するChk1及びChk2は、Cdc25Cの216番目のセリン残基をリン酸化することが知られており、Chk1またはChk2によりリン酸化されたCdc25Cに14-3-3σは結合し、核外移行させることによりCdc25Cを不活性化すると考えられている[P.Nurse(1997) Cell Vol 91, p865]。G2/M期の進行に必要な活性型Cdc2-Cyclin B複合体はWee1によりリン酸化されて不活性化され、不活性型のリン酸化Cdc2-Cyclin BはCdc25Cプロテインフォスファターゼにより脱リン酸化されて活性化される[P.Nurse(1997) Cell Vol 91, p865]ので、Chk1、Chk2の活性化と14-3-3σタンパク質の発現誘導によりG2/M期阻止が達成される。また、S期阻止はDNA損傷に伴って活性化されたChk2を経て達成されると考えられる[S.Matsuoka, et al. (1998) Science Vol 282, p1893]。このようにして明らかにされる細胞周期の調節・制御を担うタンパク質分子は標的分子として抗がん剤開発の候補となるが、細胞周期調節・制御を担うタンパク質などの生体分子もまた、量的・質的変動によりそれ自体薬剤となり得ると推測される。

【0005】p21WAF1/CIP1はCdkと結合してそのリン酸化酵素活性を阻害するという機能に着目すると、p21WAF1/CIP1を細胞周期阻害剤・阻害因子として理解できる。その結合および阻害様式の解析などにより低分子Cdk阻害ペプチドを新たな薬剤として創出できる可能性がある。実際にPKC(プロテインキナーゼC)、PKA(サイクリックAMP依存性プロテインキナーゼ)については阻害ペプチドが知られている[C.House and B.E. Kemp (1987) Science Vol 238, p1726; C.O. Brostrom and C.Kon (1974) Anal. Biochem. Vol.58, p459]。今後あらた

なタンパク質の発見はそれ自体が薬剤としての発見であるばかりでなく、その後の低分子ペプチドの開発のためにも重要な発見であるといえよう。遺伝子治療では機能遺伝子の導入により、変異または欠失した遺伝子を相補することが行われているが、シグナル伝達上の経路を一時的に遮断して、化合物（薬剤）の効果を高めるような使用も原理的には可能である。その際には変異遺伝子の本来の機能を補う効果のある細胞周期阻害タンパク質もまた遺伝子治療に应用可能となる。そうした利用に先立ち、様々なタンパク質の機能解析を行うことが必要で、その有用性の根拠となる情報を得ることが重要である。

【0006】ヒトゲノム計画によるヒトゲノムDNAの解読が行われているが、タンパク質レベルでの機能解析の終了には相当の労力を必要とするであろう。機能不明なタンパク質について新規機能を明らかにしてゆくことは、阻害剤の有機化学合成、低分子ペプチド開発などへの扉を開くことになる。タンパク質の新たな発見とタンパク質のもつ新規機能の発見は今後の製薬、医療の発展の支えとなり、薬剤として実験、治療に直接利用されることになる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかし、これまでは、タンパク質リン酸化酵素としてのChk2の活性を阻害する物質（Chk2阻害剤）は報告されていない。

【0008】本発明は、ヒトChk2リン酸化酵素の活性を阻害することができるタンパク質および該タンパク質をコードするDNAを提供することを目的とする。本発明は、さらに該タンパク質をChk2阻害剤として使用する方法及び該タンパク質および該タンパク質のcDNAをChk2阻害剤開発のリード分子として使用する方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は、ヒトChk2遺伝子から選択的スプライシング（alternative splicing）により生じるタンパク質がChk2タンパク質のタンパク質リン酸化酵素活性を阻害する機能を持つことを発見した。即ち、ヒト細胞から抽出したRNAをもとにcDNAを合成し、クローニングした。クローニングしたcDNAより、野生型ヒトChk2の337番目から365番目のアミノ酸を欠失している配列を有するcDNAを得た。これを、ベクターに組み込み発現させ、得られた野生型ヒトChk2の337番目から365番目のアミノ酸を欠失しているヒトChk2（del1;337-365）が、リン酸化酵素活性を有さず、野生型ヒトChk2のリン酸化酵素活性を阻害することを見出した。

【0010】今回発見されたタンパク質は、Chk2阻害剤として利用可能なばかりでなく、Chk2阻害剤開発の扉を開く意味においても重要な発見であり、また、細胞周期制御機構の部分的な解明に資することができる。それにより有効な癌化学療法に繋がることも期待される。

【0011】すなわち、本発明は、

（1）以下の（a）又は（b）に示すDNAからなる遺伝子。

（a）配列表の配列番号1に示す塩基配列からなるDNA。

（b）配列表の配列番号1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつヒトChk2リン酸化酵素活性を阻害するタンパク質をコードするDNA。

（2）以下の（a）又は（b）に示すタンパク質。

（a）配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質。

（b）配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトChk2リン酸化酵素活性を阻害するタンパク質。

（3）（1）に記載のDNAを含有する組換えベクター。

（4）（3）に記載のベクターを含む形質転換体。

（5）（2）に記載のタンパク質をヒトChk2リン酸化酵素活性阻害剤として使用する方法。

（6）（1）に記載のDNAまたは（2）に記載のタンパク質をChk2リン酸化酵素阻害剤開発のリード分子として使用する方法、である。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。遺伝子のクローニング、塩基配列の決定等の技術はJ. Sambrook, E.F. Fritsch & T. Maniatis (1989) : Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press及びEd Harlow and David Lane (1988) : Antibodies, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press等の当業者に良く知られた文献に記載された方法に従って行えばよい。

【0013】尚、本願明細書において、野生型Chk2をChk2-wtと、337番～365番のアミノ酸を欠失したChk2をChk2（del1;337-365）と称する。

【0014】（1）ヒトChk2をコードするcDNAの単離
ヒトChk2をコードするcDNAを単離するために、ヒト細胞株から全RNAを抽出、精製し、該RNAからcDNAを合成する。次いで、cDNAを適当なベクターへ組込む。適当な宿主をcDNAを組み込んだベクターで形質転換し、形質転換された宿主のコロニーを得て、各コロニーのインサートDNAの塩基配列を決定する。このようにして、野生型ヒトChk2のcDNA及び野生型ヒトChk2の337番目から365番目のアミノ酸に相当するエキソンを選択的スプライシングにより欠失したChk2（del1;337-365）のcDNAが得られる。

【0015】この際、全RNAを抽出する細胞として、Chk2の発現が多い細胞、例えば急性リンパ芽球性白血病患者の末梢血由来ヒトT細胞株であるJurkat細胞等が用いられる。全RNAは、例えば、グアニジン試薬、フェノー

ル試薬等で処理して得ることができる。cDNAは得られた全RNAよりオリゴdTまたはランダムプライマーおよび逆転写酵素を用いて合成することができる。cDNAをクローニングする前に Chk2をコードするcDNA配列を、遺伝子増幅反応により増幅させることが好ましい。この際、ヒト野生型Chk2遺伝子塩基配列情報をもとに適当なプライマーを設計して、用いることができる。プライマーはDNA合成装置を用いた通常の化学合成により得ることができる。

【0016】遺伝子増幅反応産物は、適当な制限酵素とリガーゼを用いる通常の方法でベクターに組込むことができる。例えば、精製された増幅産物を、適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位に挿入してベクターに連結する方法などがある。

【0017】cDNAは通常の方法によりcDNAライブラリーを作製し、その中からスクリーニングによりChk2cDNA、Chk2 (del; 337-365) cDNAを単離することもできる。

【0018】用いるベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等があげられる。プラスミドDNAとしては、pBR322、pBR325、pUC118、pUC119等の大腸菌由来のプラスミド、pUB110等の枯草菌由来のプラスミド、YEpl3、YCp50等の酵母由来のプラスミドなどがあげられ、ファージDNAとしては、λファージ等があげられる。さらに、レトロウイルスまたはワクシニアウイルス等の動物ウイルス、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスベクターも使用することができる。また、発現ベクターとして、原核生物遺伝子融合ベクターも好ましく、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を含むpGEX4T-1等が利用できる。

【0019】宿主も本発明の遺伝子を発現できるものであれば限定されず、例えば、大腸菌、枯草菌、酵母および動物細胞などが用いられる。プロモーターおよびターミネーターに関しても該ベクターを用いて形質転換する宿主に対応したものであれば特に限定されず、宿主に応じて適切な組み合わせを選択することができる。

【0020】ベクターの宿主細胞への導入も塩化カルシウムを用いる方法、エレクトロポレーション法等の通常の方法により行うことができ、これらの方法により形質転換体を得ることができる。

【0021】塩基配列の決定は、例えば、マキサム・ギルバート法 (Maxam, A.M. and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 560, 1977) 又はジデオキシ法 (Messing, J. et al., Nucl. Acids Res., 9, 309, 1981) 等により行うことができる。これらの原理を応用した塩基配列自動解析装置を用いて配列を決定することもできる。

【0022】本発明の遺伝子DNAとして、配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するヒトChk2 (del; 337-365) DNAがあげられる。また、本発明のタンパク質として

配列表の配列番号2に示す配列表の配列番号1の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を有するタンパク質があげられる。配列番号1で示されるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、ヒトChk2リン酸化酵素活性を阻害し得るタンパク質をコードするDNAも本発明のDNAに含まれる。ここで、ストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件は、相溶性が高いDNA同士、例えば80~90パーセント以上の相溶性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相溶性の低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーション洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SSD、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件があげられる。このようなDNAは、例えば部位特異的変異法によって、1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されるように本発明のDNAの塩基配列を改変することによって得られる。

【0023】また、配列番号2で示されるアミノ酸配列の1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつヒトChk2リン酸化酵素活性を阻害し得るタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。欠失、置換または付加されるアミノ酸の位置は限られず、例えばタンパク質のN末端若しくはC末端のアミノ酸が欠失していても、N末端若しくはC末端にアミノ酸が付加されていても、またヒトChk2 (del; 337-365) タンパク質の337番目のアミノ酸のN末端側のアミノ酸が欠失していても、337番目のアミノ酸のC末端側のアミノ酸が欠失していても、337番目のアミノ酸のN末端若しくはC末端側にアミノ酸が付加されていても、ヒトChk2リン酸化酵素活性を阻害し得るタンパク質は、本発明のタンパク質に含まれる。

【0024】(2) リコンビナントタンパク質の発現と精製

得られた形質転換体は、通常の方法により培養することができ、本発明遺伝子によりコードされる目的のタンパク質が生産、発現される。培養時の培地としては、宿主細胞に応じて通常使用されるものを適宜使用でき、培養条件も宿主細胞の生育に適した条件を適宜採用することができる。

【0025】リコンビナントタンパク質は、各種の分離精製方法により、分離・精製することができる。例えば、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独でまたは適宜組合せて用いることができる。この際、発現産物がGST等との融合タンパク質として発現される場合は、目的タンパク質と融合しているタンパク質の性質を利用して精製することもできる。例えば、GSTはグルタチオンに対して親和性を有するので、グルタチオンを担体に結合させたカラムを用いるアフィニティー

クロマトグラフィーにより効率的に精製することができる。

【0026】得られたタンパク質のリン酸化酵素活性は、適当な基質を用いて測定することができる。例えば、ヒトChk2はヒトCdc25Cの216番目のセリン残基をリン酸化することが知られているので、ヒトCdc25Cタンパク質または216番目のセリン残基を含む部分ポリペプチドを基質として用いることができる。活性の測定は該基質のリン酸化の程度を測定することにより可能である。例えば、リン酸化酵素活性を測定しようとするタンパク質、前記基質および ^{32}P 標識ATPを適当な温度で適当な時間接触させ、 ^{32}P の取り込みをオートラジオグラフィで検出することにより、リン酸化酵素活性を測定することができる。

【0027】また、リン酸化を特異的に認識する抗リン酸化ペプチド特異抗体、抗リン酸化セリン抗体、抗リン酸化トレオニン抗体等を用いて、リン酸化を調べることができる。また、ペプチドを基質に用いた場合にはリン酸化反応の後に、カルボキシルペプチダーゼ等により限定分解し、マスマスペクトルに供することによりリン酸化部位の決定およびリン酸化の程度を検出することもできる。

【0028】(3) Chk2リン酸化酵素活性の阻害
Chk2リン酸化酵素活性の阻害は、上述のリン酸化酵素活性の測定時に、Chk2リン酸化酵素活性阻害活性があるかどうか調べようとするタンパク質等の化合物を添加し、リン酸化がどの程度阻害されるかを調べることににより測定することができる。この際、ヒトChk2タンパク質の自己リン酸化活性を有することを利用して阻害活性を測定することができる。例えば、ヒトChk2タンパク質、阻害活性があるかどうか調べようとするタンパク質等の化合物および ^{32}P 標識ATPを適当な温度で適当な時間接触させ、 ^{32}P のChk2への取り込みをオートラジオグラフィで検出することにより測定することもできる。

【0029】(4) 本願発明に係るDNAまたはタンパク質のヒトChk2リン酸化酵素活性阻害剤開発のためのリード分子としての使用

本発明に係るヒトChk2 (del;337-365) のcDNAおよびタンパク質をChk2阻害剤開発のリード分子として使用することもできる。例えば、ヒトChk2 (del;337-365) のcDNAまたはタンパク質を改変することにより、新たなChk2阻害剤を開発し得る。

【0030】Chk2 (del;337-365) は、Chk2-wtのリン酸化酵素活性を阻害する効果を示した。このことは、Chk2 (del;337-365) 分子内の特定のペプチド配列が阻害効果を示したと考えることができる。欠失変異体を作製し、それぞれについてChk2-wtのリン酸化酵素活性に対する阻害効果を調べ、阻害効果を示す部分領域を絞ることで阻害ペプチド配列を決定することができる。一種類のペプチドだけが阻害効果に関与しているとは限らない

ので、ペプチドの組み合わせにより阻害効果を調べることが必要である。こうした阻害ペプチド配列の同定方法は公知の方法である。

【0031】阻害ペプチドが得られれば、部位特異的変異導入または有機化学合成によりそのアミノ酸配列に変異を導入して阻害効果を高めるペプチド変異体の作製操作が可能である。アミノ酸配列操作により得られた変異体の阻害効果の関係より阻害効果に必須となるアミノ酸配列を決定し、コンセンサス配列を決定する。コンセンサス配列情報をもとに、可変可能な配列部位にさらに変異を加えることで阻害効果の増強を図ることができる。こうして阻害ペプチド配列の改良を行うことが可能であるが、この改良方法もまた公知の方法である。

【0032】Chk2-wtでは分子内部にあるが、Chk2 (del;337-365) では外部に向けられた部分配列が阻害効果に影響していると考えられることもできる。故に、Chk2-wtとChk2 (del;337-365) のX線構造解析をおこない、両者の構造(コンフォメーション)を比較することも重要である。阻害ペプチド配列の提示のされ方が阻害効果の発現に必須であるのならば、Chk2 (del;337-365) 分子内で提示される構造を模倣可能なアダプター配列を導入することで阻害ペプチドとして利用することが可能である。

【0033】阻害ペプチドを利用してChk2-wt分子上の標的部位を決定することは、Chk2阻害剤として作用する低分子化合物を開発する上では標的部位の提供という意味がある。活性中心を阻害剤の標的部位として利用することができるが、阻害効果をもたらすアロステリック部位もまた重要な標的部位である。しかし、タンパク質リン酸化酵素の活性中心の配列情報は広く知られていることから、アロステリック部位に関する情報を得ることが創薬において大きな意味がある。時として新規阻害性タンパク質・ペプチドはそうした阻害剤の分子設計に重要な情報を提供することが可能である。

【0034】実際に阻害ペプチドを利用してChk2-wt分子上の標的を決定するにあたり、まず、Chk2-wtに対する作用機序を明らかにすることから始めることができる。酵素阻害剤は二つの群、可逆的阻害剤、不可逆的阻害剤に分類される。前者は、透析などの方法で阻害剤を除くと活性が回復するが、後者は阻害剤を除去しても活性は元に戻らないことで調べられる。可逆的阻害剤は、さらに拮抗阻害剤、非拮抗阻害剤、半拮抗阻害剤に分類される。拮抗阻害剤は酵素の活性中心と結合することができ、基質と競り合うものである。したがって、阻害の程度は基質と阻害剤の相対濃度に依存し、基質濃度を適当に増加させることによって阻害を完全に除くことができる。酵素反応速度論上では、Michaelis定数(K_m)の見かけの値を増大させ、反応速度(V)は減少する。非拮抗阻害剤は基質が結合する活性中心以外で酵素と結合して阻害効果を生じるものである。その阻害度は、阻害

剤の濃度のみに依存し、基質の濃度を変化させても変化しな位。酵素反応速度論上ではVに作用する。反拮抗阻害剤は遊離の酵素とは結合できないが、酵素-基質複合体またはそれ自体基質とは結合できない酵素分子種と結合するものである。反拮抗阻害剤は、KmとVに影響を及ぼし、両者を同じ程度に減少させる。こうした作用機序は阻害剤を添加または無添加のもとで酵素反応速度を調べ、Lineweaver-Burkプロットを行うことで明らかにできる。得られた阻害ペプチドの作用機序がどの分類に当てはまるか調べることで、阻害ペプチドの標的部位の同定以前に阻害効果を示す活性中心以外に関する情報が得られるか否か知ることができる。

【0035】X線構造解析により阻害ペプチドとChk2-wtとの結合を調べ、阻害ペプチドのChk2-wt分子上の標的部位を決定する。明らかにされる活性阻害をおこす部位の分子構造をもとに、阻害剤としての低分子化合物を分子設計することができる。Chk2 (del; 337-365) はリード分子として以上のような阻害ペプチド開発に利用されるだけでなく、そうした低分子阻害剤の有機化学合成においても一連の阻害剤開発の道を開くことにも利用できる。

【0036】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

【0037】実施例1 ヒトChk2をコードするcDNAの単離

(1) Chk2増幅用プライマーの設定

Chk2(全長543アミノ酸)をコードするcDNA配列を増幅するため、以下に示すChk2-FとChk2-Rプライマーを設定した。フォワードプライマー(Chk2-F); 5'-CAT GAA TTC A TG TCT CGG GAG TCG GAT GTT-3' (配列番号9、5'側3つの塩基(CAT)は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5'側4番目から9番目(GAATTC)は制限酵素EcoRIサイト。) リバースプライマー(Chk2-R); 5'-CAT CTC GAG CAA CAC AGC AGC ACA CAC AGC-3' (配列番号10、5'側3つの塩基(CAT)は制限酵素処理を円滑におこなわせるためのもの。5'側4番目から9番目(CTCGAG)は制限酵素XhoIサイト。)

【0038】(2) 鋳型DNAの調整

Chk2をコードする遺伝子をPCR法で増幅するための鋳型として、急性リンパ芽球性白血病患者の末梢血由来ヒトT細胞株であるJurkat細胞のcDNAを用いた。まず、cDNAを作製するため、Jurkat細胞よりフェノール-チオシアン酸グアニジン法(ニッポンジーン、ISOGEN)を用いてtotal RNAを抽出、精製した。抽出したtotal RNAをもとにオリゴdTまたはオリゴランダムプライマーを用いてcDNAを合成した(逆転写反応)。

【0039】(3) PCR反応

ポリメラーゼ反応バッファー[20mM Tris/HCl (pH8.8), 2

mM MgSO₄, 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1mg/ml nuclease-free BSA, 0.2mM dATP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dTTP, 0.2mM dGTP, 400nMフォワードプライマー、400nMリバースプライマー、2.5 units PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社製)]に上記cDNAを加え、以下に示す3段階のPCR反応を行った。

ステップ1; 95℃5分間(変性)、52℃1分間(アニーリング)、72℃2分間(伸長)を1サイクル

ステップ2; 94℃30秒間(変性)、62℃30秒間(アニーリング)、72℃2分間(伸長)を35サイクル

ステップ3; 72℃10分を1サイクル

【0040】(4) 発現ベクターへのクローニング
Chk2-F, Chk2-Rプライマーセットで増幅されたPCR産物をEcoRIとXhoIでそれぞれ消化した。制限酵素消化DNAはアガロースゲル電気泳動に供した後、EASYTRAP Ver. 2 (TAKARA社製)で精製した。精製DNAを、予めPCR産物の両末端と同じ制限酵素EcoRIとXhoIにより消化された大腸菌発現ベクターpGEX4T-1 (Pharmacia社製)へライゲーションした。ライゲーション後はMolecular Cloning (Cold Spring Harbour Laboratory)の方法に従って大腸菌(DH5α)株を形質転換し、複数のシングルコロニーを取得した。

【0041】(5) 塩基配列の確認

Molecular Cloningの方法に従い、各シングルコロニーからプラスミドDNAを精製した。そのインサートDNAの塩基配列の決定をサンガー法に基づき、オートシーケンサーで行なった。インサートDNAの配列とデータベース上に公開されている配列を比較し、それと同じ野生型(wild type; wt)ヒトChk2 (Chk2-wt)のcDNA配列であることを確認した。また、Chk2-wtの337番目から365番目のアミノ酸に相当するエキソンを選択的スプライシング(alternative splicing)により欠失したChk2 (del; 337-365)の配列であることを確認した。Chk2 (del; 337-365)の塩基配列を配列番号1に、Chk2 (del; 337-365)の推定アミノ酸配列を配列番号2に、Chk2-wtの塩基配列を配列番号3に、Chk2-wtの推定アミノ酸配列を配列番号4に、それぞれ示す。Chk2 (del; 337-365)の配列についてはDNA Data Bank of Japan (DDBJ)に登録した(アクセッション番号: AB040105)。

【0042】実施例2 タンパク質リン酸化能欠失変異体の作製

(1) 変異導入プライマーの設定

Chk2の活性中心の一つである368番目のアスパラギン酸残基(D368)をグルタミン酸残基(E)に変換してChk2の酵素活性を欠失させるため、以下のプライマーを設定した。

<D368Eプライマー>

フォワードプライマー(D368E-F); 5'-TGT CTT ATA AAG ATT ACT GAA TTT GGG CAC-3' [配列番号11、5'側21番目の塩基(A)によりコドンはGATからGAAになる。Dから

Eへの変異を導入するためのもの。]

リバースプライマー (D368E-R) ; 5'-AAT CTT GGA GTG CCC AAA TTC AGT AATCTT-3' [配列番号12、5'側19番目の塩基 (T) により相補鎖のコドンはGATからGAAになる。DからEへの変異を導入するためのもの。]

【0043】(2) PCR反応

ポリメラーゼ反応バッファー [20mM Tris/HCl (pH8.8), 2mM MgSO₄, 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100, 0.1mg/ml nuclease-free BSA, 0.2mM dATP, 0.2mM dCTP, 0.2mM dTTP, 0.2mM dGTP, 400nM フォワードプライマー、400nM リバースプライマー, 2.5 units PfuTurbo DNA polymerase (Stratagene社製)] に10ng pGEX4T-1-Chk2を加え、以下に示す3段階のPCR反応を行った。PCR 反応は以下の3段階の条件で行った。

ステップ1 ; 95°C30秒間 (変性)

ステップ2 ; 95°C30秒間 (変性)、55°C60秒間 (アニール)、68°C7分間 (伸長) を16サイクル

ステップ3 ; 68°C 7分 (伸長)、4°C10分を1サイクル

【0044】(3) 形質転換

PCR反応終了後の反応液中に制限酵素DpnIを10unit加え、37°Cに30分間保温することにより鋳型のpGEX4T-1-Chk2を分解した。PCRにより変異が導入されたプラスミドはDpnI処理では分解されないの、DpnI処理後の反応液を用いて大腸菌を形質転換し、複数のシングルコロニーを得た。

【0045】(4) 塩基配列の確認

Molecular Cloningの方法に従い、各シングルコロニーからプラスミドDNAを精製した。そのインサートDNAの塩基配列の決定をサンガー法に基づき、オートシーケンサーで行ない、変異が導入されていることを確認した。Chk2-wtの368番目のアミノ酸残基がグルタミン酸残基 (E) に置換されたクローンをChk2-D368Eと名付けた。その塩基配列および推定アミノ酸配列は、それぞれ配列番号5および配列番号6に示す。

【0046】実施例3 リコンビナントタンパク質の発現と精製

(1) リコンビナントChk2の発現と精製

pGEX4T-1ベクターに組み込まれたChk2は、大腸菌内でグルタチオン-s-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質としてリコンビナントタンパク質が作られる。このGST酵素がグルタチオン (GSH) に対して親和性を持つことを利用して、リコンビナントタンパク質の精製を行った。リコンビナントタンパク質の発現を確認した後、その菌体を1% Tween 20-PBS, pH8.5に懸濁後、超音波処理により菌体を破碎した。高速遠心後、上清をリコンビナントタンパク質を含む可溶性画分とした。この可溶性画分を GSH - セファロース 4B カラム (Pharmacia社製) に通し、GST-Chk2タンパク質をカラムに吸着させた。カラムをWE buffer [10 mM 2-メルカプトエタノール, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl (pH7.5)] で洗浄

後、リコンビナントタンパク質をG buffer [10 mM GSH, 50 mM Tris/HCl (pH9.6)] を用いて溶出した。溶出されたGST-Chk2タンパク質は20mM Tris/HCl (pH7.5), 1mM DTT, 1mM EDTA, 50%グリセロールに対して透析を行い、透析後は-70°Cに保存した。

【0047】(2) 活性測定用基質の作製

ヒトChk2はヒトCdc25Cの216番目のセリン残基をリン酸化することが知られている [S.Matsuoka, et al. (1998) Science Vol 282, p1893]。そこで、ヒトCdc25Cのアミノ酸167番目から267番目をコードするcDNA配列を発現ベクターpGEX4T-1に組み込み、大腸菌内で発現されるグルタチオン-s-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質GST-Cdc25C (167-267) をChk2の基質として使用した。リコンビナントタンパク質の発現を確認した後、その菌体を1% Tween 20-PBS, pH8.5に懸濁後、超音波処理により菌体を破碎した。高速遠心後、上清をリコンビナントタンパク質を含む可溶性画分とした。この可溶性画分を GSH - セファロース 4B カラム (Pharmacia社製) に通し、GST-Cdc25C (167-267) タンパク質をカラムに吸着させた。カラムをWE buffer [10 mM 2-メルカプトエタノール, 2 mM MgCl₂, 20 mM Tris/HCl (pH7.5)] で洗浄後、リコンビナントタンパク質をG buffer [10 mM GSH, 50 mM Tris/HCl (pH9.6)] を用いて溶出した。溶出されたGST-Cdc25C (167-267) タンパク質はPBS, 50%グリセロールに対して透析し、透析後は-20°Cに保存した。Cdc25Cの167番目から267番目をコードするcDNA配列およびアミノ酸配列をそれぞれ配列番号7および配列番号8に示す。

【0048】(3) タンパク質リン酸化酵素活性の検出
上記精製リコンビナントGST-Chk2 (wt, del;337-365, または D368E) を含む1xリン酸化反応液 [20mM HEPES/KOH (pH7.5), 10mM MgCl₂, 10mM MnCl₂, 100μM ATP, 370kBq γ-³²P-ATP, 1mM DTT] を30°Cに保温し、30分後に当量の2 x SDS化buffer [125mM Tris/HCl (pH6.8), 10% 2-メルカプトエタノール, 4% SDS, 0.006% ブロモフェノールブルー, 20% グリセロール] と混合して反応を停止した。その反応物をSDS-PAGEに供し、乾燥後に撮ったゲルのオートラジオグラフではGST-Chk2-wtでのみ自己リン酸化が認められた。また、基質としてGST-Cdc25C (167-267) を用いると、³²Pの取り込みがGST-Chk2-wtでのみ認められた。これらのことからGST-Chk2-wtはタンパク質リン酸化酵素活性を有するが、GST-Chk2 (del;337-365) およびGST-Chk2 (D368E) では欠失していることが確認された。

【0049】実施例4 Chk2リン酸化酵素活性への阻害効果

(1) 試験管内での阻害効果

GST-Chk2-wtを含む1xリン酸化反応液にGST-Chk2 (del;337-365) またはGST-Chk2 (D368E) を添加し、30°C30分間保温することによりGST-Chk2-wtのタンパク質リン酸化酵素活性に対する影響を調べた。2 x SDS化bufferを添加することにより反応を停止した。反応物をSDS-PAGEに供

し、乾燥後のゲルのオートラジオグラフを撮ると、GST-Chk2 (del;337-365)の添加量の増加に従い、GST-Chk2-wtの自己リン酸化活性の減少が認められた (Figure 1 A)。しかし、GST-Chk2 (D368E)の添加量を増加させてもGST-Chk2-wtの自己リン酸化活性の減少は認められない (Figure 1B)。このことから、GST-Chk2 (del;337-365)がGST-Chk2-wtのタンパク質リン酸化酵素活性を阻害することが示された。Figure 1Bで 32 Pの取り込みが変化しているのは、GST-Chk2 (D368E)を添加することにより反応液中の自己リン酸化部位が増加するためである。

【0050】(2) 細胞内での阻害効果

細胞内でのChk2 (del;337-365)のChk2-wtに対する阻害活性を調べるために、pGEX4T-1にクローニングされていたインサート配列を哺乳動物細胞発現ベクターに組換えた。即ち、pGEX4T-1-Chk2 (del;337-365)をEcoRIおよびXhoIで消化後pcDNA3-HAおよびpEF-HAに、pGEX4T-1-Chk2-wtをEcoRIおよびXhoIで消化後pcDNA3-FLAGに組換えた。pcDNA3-HAに組み込まれたChk2 (del;337-365)はアミノ末端側に、pEF-HAに組み込まれたChk2 (del;337-365)はカルボキシル末端側にHA-tagを付加した形で発現する。また、pcDNA3-FLAGに組み込まれたChk2-wtはカルボキシル末端側にFLAG-tagを付加した形で発現する。

【0051】pcDNA3-Chk2-wt-FLAGとpcDNA3-HA-Chk2 (del;337-365)またはpEF-Chk2 (del;337-365)-HAをTrans IT-LT1 (Mirus社製)を用いてヒト293T細胞へ同時にトランスフェクトした (cotransfection)。その2日後、氷冷PBSで洗った細胞をNETN150 [20mM Tris/HCl (pH8.0), 1mM EDTA, 0.5% NP-40, 150mM NaCl, 1mM PMSF, 10mM β -グリセロリン酸, 1mM NaF, 0.1mM NaVO_4]に懸濁し、氷上に15分間静置した。遠心分離後の上清を細胞抽出液とし、そこにプロテインAセファロース (ファルマシア社製)を添加して4°Cで1時間攪拌した (プレクリアー)。再び遠心分離することにより得られた上清に抗FLAG M2 モノクローナル抗体 (Sigma社製)およびプロテインAセファロースを添加し、4°Cで1時間攪拌した (免疫沈降)。遠心分離によって得られた免疫沈降物を100mM Tris/HCl (pH8.0), 0.5M LiClで遠心洗浄し、続いて、免疫沈降物を20mM HEPES/KOH (pH7.5), 10mM MgCl_2 , 10mM MnCl_2 で遠心洗浄した。洗浄後の免疫沈降物を1 μ gのGST-Cdc2

5C (167-267)を含む1xリン酸化反応液中に懸濁後、30°C 30分間リン酸化反応を行った。反応の停止は2x SDS化bufferを添加することにより行った。反応液をSDS-PAGEに供し、乾燥ゲルのオートラジオグラフをとることで基質に用いたGST-Cdc25C (167-267)への 32 Pの取り込みと自己リン酸化によるChk2-wt-FLAGへの 32 Pの取り込みを検出した (Figure 2)。HA-Chk2 (del;337-365)またはChk2 (del;337-365)-HAの増加に伴い、GST-Cdc25C (167-267)への 32 Pの取り込みとChk2-wt-FLAGへの 32 Pの取り込みが共に減少することから、Chk2 (del;337-365)がChk2-wtのリン酸化酵素活性を阻害することが明らかとなった。

【0052】結語

本実施例中で示したようにChk2 (del;337-365)はChk2-D368Eと同様にリン酸化酵素活性を欠失しているがChk2-wtのリン酸化酵素活性を阻害する活性を持つ。これまでChk2のリン酸化酵素機能の阻害剤は知られていない。Chk2 (del;337-365)をChk2のリン酸化酵素阻害剤 (Chk2阻害剤)として使用することが可能であり、今後のChk2阻害剤の開発に応用することが可能である。

【0053】また、Chk2 (del;337-365)は選択的スプライシングによりChk2遺伝子から転写・翻訳されるタンパク質分子であり、生体内に存在する分子である。生体内ではChk2の活性の制御を行うために、選択的スプライシングによりChk2 (del;337-365)タンパク質が発現されるということはその生物学的意義として理解できる。その生物学的意義はともあれ、Chk2 (del;337-365)がChk2阻害剤として機能するという事実はChk2のリン酸化酵素機能を低下させる目的としてChk2 (del;337-365)を遺伝子治療に利用可能であることを示している。

【0054】

【発明の効果】今回発見されたタンパク質は、Chk2阻害剤として利用可能なばかりでなく、Chk2阻害剤開発の扉を開く意味においても重要な発見であり、また、細胞周期制御機構の部分的な解明に資することができる。それにより有効な癌化学療法に繋がることも期待される。

【0055】

【配列表】

【化1】

SEQUENCE LISTING

<110> MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO.,LTD

<120> A protein inhibiting human Chk2 kinase activity

<130> 43903

<140>

<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1542

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1542)

<400> 1

| | |
|---|-----|
| atg tct cgg gag tcg gat gtt gag gct cag cag tct cat ggc agc agt | 48 |
| Met Ser Arg Glu Ser Asp Val Glu Ala Gln Gln Ser His Gly Ser Ser | |
| 1 5 10 15 | |
| gcc tgt tca cag ccc cat ggc agc gtt acc cag tcc caa ggc tcc tcc | 96 |
| Ala Cys Ser Gln Pro His Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Gly Ser Ser | |
| 20 25 30 | |
| tca cag tcc cag ggc ata tcc agc tcc tct acc agc acg atg cca aac | 144 |
| Ser Gln Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Met Pro Asn | |
| 35 40 45 | |

| | |
|---|-----|
| tcc agc cag tcc tct cac tcc agc tct ggg aca ctg agc tcc tta gag | 192 |
| Ser Ser Gln Ser Ser His Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Glu | |
| 50 55 60 | |
| aca gtg tcc act cag gaa ctc tat tct att cct gag gac caa gaa cct | 240 |
| Thr Val Ser Thr Gln Glu Leu Tyr Ser Ile Pro Glu Asp Gln Glu Pro | |
| 65 70 75 80 | |
| gag gac caa gaa cct gag gag cct acc cct gcc ccc tgg gct cga tta | 288 |
| Glu Asp Gln Glu Pro Glu Glu Pro Thr Pro Ala Pro Trp Ala Arg Leu | |
| 85 90 95 | |
| tgg gcc ctt cag gat gga ttt gcc aat ctt gaa tgt gtg aat gac aac | 336 |
| Trp Ala Leu Gln Asp Gly Phe Ala Asn Leu Glu Cys Val Asn Asp Asn | |
| 100 105 110 | |
| tac tgg ttt ggg agg gac aaa agc tgt gaa tat tgc ttt gat gaa cca | 384 |
| Tyr Trp Phe Gly Arg Asp Lys Ser Cys Glu Tyr Cys Phe Asp Glu Pro | |
| 115 120 125 | |
| ctg ctg aaa aga aca gat aaa tac cga aca tac agc aag aaa cac ttt | 432 |
| Leu Leu Lys Arg Thr Asp Lys Tyr Arg Thr Tyr Ser Lys Lys His Phe | |
| 130 135 140 | |
| cgg att ttc agg gaa gtg ggt cct aaa aac tct tac att gca tac ata | 480 |
| Arg Ile Phe Arg Glu Val Gly Pro Lys Asn Ser Tyr Ile Ala Tyr Ile | |
| 145 150 155 160 | |
| gaa gat cac agt ggc aat gga acc ttt gta aat aca gag ctt gta ggg | 528 |
| Glu Asp His Ser Gly Asn Gly Thr Phe Val Asn Thr Glu Leu Val Gly | |
| 165 170 175 | |
| aaa gga aaa cgc cgt cct ttg aat aac aat tct gaa att gca ctg tca | 576 |
| Lys Gly Lys Arg Arg Pro Leu Asn Asn Asn Ser Glu Ile Ala Leu Ser | |
| 180 185 190 | |

| | |
|---|------|
| cta agc aga aat aaa gtt ttt gtc ttt ttt gat ctg act gta gat gat | 624 |
| Leu Ser Arg Asn Lys Val Phe Val Phe Phe Asp Leu Thr Val Asp Asp | |
| 195 200 205 | |
| cag tca gtt tat cct aag gca tta aga gat gaa tac atc atg tca aaa | 672 |
| Gln Ser Val Tyr Pro Lys Ala Leu Arg Asp Glu Tyr Ile Met Ser Lys | |
| 210 215 220 | |
| act ctt gga agt ggt gcc igt gga gag gta aag ctg gct ttc gag agg | 720 |
| Thr Leu Gly Ser Gly Ala Cys Gly Glu Val Lys Leu Ala Phe Glu Arg | |
| 225 230 235 240 | |
| aaa aca tgt aag aaa gta gcc ata aag atc atc agc aaa agg aag ttt | 768 |
| Lys Thr Cys Lys Lys Val Ala Ile Lys Ile Ile Ser Lys Arg Lys Phe | |
| 245 250 255 | |
| gct att ggt tca gca aga gag gca gac cca gct ctc aat gtt gaa aca | 816 |
| Ala Ile Gly Ser Ala Arg Glu Ala Asp Pro Ala Leu Asn Val Glu Thr | |
| 260 265 270 | |
| gaa ata gaa att ttg aaa aag cta aat cat cct tgc atc atc aag att | 864 |
| Glu Ile Glu Ile Leu Lys Lys Leu Asn His Pro Cys Ile Ile Lys Ile | |
| 275 280 285 | |
| aaa aac tti tti gai gca gaa gat tat tat att gtt ttg gaa ttg atg | 912 |
| Lys Asn Phe Phe Asp Ala Glu Asp Tyr Tyr Ile Val Leu Glu Leu Met | |
| 290 295 300 | |
| gaa ggg gga gag ctg ttt gac aaa gtg gtg ggg aat aaa cgc ctg aaa | 960 |
| Glu Gly Gly Glu Leu Phe Asp Lys Val Val Gly Asn Lys Arg Leu Lys | |
| 305 310 315 320 | |
| gaa gct acc tgc aag ctc tat ttt tac cag atg ctc ttg gct gtg cag | 1008 |
| Glu Ala Thr Cys Lys Leu Tyr Phe Tyr Gln Met Leu Leu Ala Val Gln | |
| 325 330 335 | |

| | |
|---|------|
| att act gat ttt ggg cac tcc aag att ttg gga gag acc tct ctc atg | 1056 |
| Ile Thr Asp Phe Gly His Ser Lys Ile Leu Gly Glu Thr Ser Leu Met | |
| 340 345 350 | |
| aga acc tta tgt gga acc ccc acc tac ttg gcg cct gaa gtt ctt gtt | 1104 |
| Arg Thr Leu Cys Gly Thr Pro Thr Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Val | |
| 355 360 365 | |
| tct gtt ggg act gct ggg tat aac cgt gct gtg gac tgc tgg agt tta | 1152 |
| Ser Val Gly Thr Ala Gly Tyr Asn Arg Ala Val Asp Cys Trp Ser Leu | |
| 370 375 380 | |
| gga gtt att ctt ttt atc tgc ctt agt ggg tat cca cct ttc tct gag | 1200 |
| Gly Val Ile Leu Phe Ile Cys Leu Ser Gly Tyr Pro Pro Phe Ser Glu | |
| 385 390 395 400 | |
| cat agg act caa gtg tca ctg aag gat cag atc acc agt gga aaa tac | 1248 |
| His Arg Thr Glu Val Ser Leu Lys Asp Gln Ile Thr Ser Gly Lys Tyr | |
| 405 410 415 | |
| aac ttc att cct gaa gtc igg gca gaa gtc tca gag aaa gct ctg gac | 1296 |
| Asn Phe Ile Pro Glu Val Trp Ala Glu Val Ser Glu Lys Ala Leu Asp | |
| 420 425 430 | |
| ctt gtc aag aag itg itg gta gtg gat cca aag gca cgt ttt acg aca | 1344 |
| Leu Val Lys Lys Leu Leu Val Val Asp Pro Lys Ala Arg Phe Thr Thr | |
| 435 440 445 | |
| gaa gaa gcc ita aga cac ccg tgg ctt cag gat gaa gac aig aag aga | 1392 |
| Glu Glu Ala Leu Arg His Pro Trp Leu Gln Asp Glu Asp Met Lys Arg | |
| 450 455 460 | |
| aag tti caa gat cti ctg tct gag gaa aat gaa tcc aca gct cta ccc | 1440 |
| Lys Phe Gln Asp Leu Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Thr Ala Leu Pro | |
| 465 470 475 480 | |

cag gtt cta gcc cag cct ict act agt cga aag cgg ccc cgt gaa ggg 1488
 Gln Val Leu Ala Gln Pro Ser Thr Ser Arg Lys Arg Pro Arg Glu Gly
 485 490 495

gaa gcc gag ggt gcc gag acc aca aag cgc cca gct gtg tgt gct gct 1536
 Glu Ala Glu Gly Ala Glu Thr Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala
 500 505 510

gtg ttg 1542
 Val Leu

<210> 2
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Ser Arg Glu Ser Asp Val Glu Ala Gln Gln Ser His Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Cys Ser Gln Pro His Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Gly Ser Ser
 20 25 30

Ser Gln Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Met Pro Asn
 35 40 45

Ser Ser Gln Ser Ser His Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Glu
 50 55 60

Thr Val Ser Thr Gln Glu Leu Tyr Ser Ile Pro Glu Asp Gln Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Gln Glu Pro Glu Glu Pro Thr Pro Ala Pro Trp Ala Arg Leu
 85 90 95

Trp Ala Leu Gln Asp Gly Phe Ala Asn Leu Glu Cys Val Asn Asp Asn
 100 105 110
 Tyr Trp Phe Gly Arg Asp Lys Ser Cys Glu Tyr Cys Phe Asp Glu Pro
 115 120 125
 Leu Leu Lys Arg Thr Asp Lys Tyr Arg Thr Tyr Ser Lys Lys His Phe
 130 135 140
 Arg Ile Phe Arg Glu Val Gly Pro Lys Asn Ser Tyr Ile Ala Tyr Ile
 145 150 155 160
 Glu Asp His Ser Gly Asn Gly Thr Phe Val Asn Thr Glu Leu Val Gly
 165 170 175
 Lys Gly Lys Arg Arg Pro Leu Asn Asn Asn Ser Glu Ile Ala Leu Ser
 180 185 190
 Leu Ser Arg Asn Lys Val Phe Val Phe Phe Asp Leu Thr Val Asp Asp
 195 200 205
 Gln Ser Val Tyr Pro Lys Ala Leu Arg Asp Glu Tyr Ile Met Ser Lys
 210 215 220
 Thr Leu Gly Ser Gly Ala Cys Gly Glu Val Lys Leu Ala Phe Glu Arg
 225 230 235 240
 Lys Thr Cys Lys Lys Val Ala Ile Lys Ile Ile Ser Lys Arg Lys Phe
 245 250 255
 Ala Ile Gly Ser Ala Arg Glu Ala Asp Pro Ala Leu Asn Val Glu Thr
 260 265 270
 Glu Ile Glu Ile Leu Lys Lys Leu Asn His Pro Cys Ile Ile Lys Ile
 275 280 285

Lys Asn Phe Phe Asp Ala Glu Asp Tyr Tyr Ile Val Leu Glu Leu Met
 290 295 300
 Glu Gly Gly Glu Leu Phe Asp Lys Val Val Gly Asn Lys Arg Leu Lys
 305 310 315 320
 Glu Ala Thr Cys Lys Leu Tyr Phe Tyr Gln Met Leu Leu Ala Val Gln
 325 330 335
 Ile Thr Asp Phe Gly His Ser Lys Ile Leu Gly Glu Thr Ser Leu Met
 340 345 350
 Arg Thr Leu Cys Gly Thr Pro Thr Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Val
 355 360 365
 Ser Val Gly Thr Ala Gly Tyr Asn Arg Ala Val Asp Cys Trp Ser Leu
 370 375 380
 Gly Val Ile Leu Phe Ile Cys Leu Ser Gly Tyr Pro Pro Phe Ser Glu
 385 390 395 400
 His Arg Thr Gln Val Ser Leu Lys Asp Gln Ile Thr Ser Gly Lys Tyr
 405 410 415
 Asn Phe Ile Pro Glu Val Trp Ala Glu Val Ser Glu Lys Ala Leu Asp
 420 425 430
 Leu Val Lys Lys Leu Leu Val Val Asp Pro Lys Ala Arg Phe Thr Thr
 435 440 445
 Glu Glu Ala Leu Arg His Pro Trp Leu Gln Asp Glu Asp Met Lys Arg
 450 455 460
 Lys Phe Gln Asp Leu Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Thr Ala Leu Pro
 465 470 475 480

Gln Val Leu Ala Gln Pro Ser Thr Ser Arg Lys Arg Pro Arg Glu Gly
 485 490 495

Glu Ala Glu Gly Ala Glu Thr Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala
 500 505 510

Val Leu

<210> 3

<211> 1629

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1629)

<400> 3

atg tct cgg gag tcg gat gtt gag gct cag cag tct cat ggc agc agt 48
 Met Ser Arg Glu Ser Asp Val Glu Ala Gln Gln Ser His Gly Ser Ser
 1 5 10 15

gcc tgt tca cag ccc cat ggc agc gtt acc cag tcc caa ggc tcc tcc 96
 Ala Cys Ser Gln Pro His Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Gly Ser Ser
 20 25 30

tca cag tcc cag ggc ata tcc agc tcc tct acc agc acg atg cca aac 144
 Ser Gln Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Met Pro Asn
 35 40 45

tcc agc cag tcc tct cac tcc agc tct ggg aca ctg agc tcc tta gag 192
 Ser Ser Gln Ser Ser His Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Glu
 50 55 60

| | |
|---|-----|
| aca gtg tcc act cag gaa etc iai tct att cct gag gac caa gaa cct | 240 |
| Thr Val Ser Thr Gln Glu Leu Tyr Ser Ile Pro Glu Asp Gln Glu Pro | |
| 65 70 75 80 | |
| gag gac caa gaa cct gag gag cct acc cct gcc ccc tgg gct cga tta | 288 |
| Glu Asp Gln Glu Pro Glu Glu Pro Thr Pro Ala Pro Trp Ala Arg Leu | |
| 85 90 95 | |
| tgg gcc ctt cag gai gga itt gcc aat ctt gaa tgt gtg aat gac aac | 336 |
| Trp Ala Leu Glu Asp Gly Phe Ala Asn Leu Glu Cys Val Asn Asp Asn | |
| 100 105 110 | |
| tac tgg ttt ggg agg gac aaa agc tgt gaa tat tgc ttt gat gaa cca | 384 |
| Tyr Trp Phe Gly Arg Asp Lys Ser Cys Glu Tyr Cys Phe Asp Glu Pro | |
| 115 120 125 | |
| ctg ctg aaa aga aca gat aaa tac cga aca tac agc aag aaa cac ttt | 432 |
| Leu Leu Lys Arg Thr Asp Lys Tyr Arg Thr Tyr Ser Lys Lys His Phe | |
| 130 135 140 | |
| cgg att ttc agg gaa gtg ggt cct aaa aac tct tac att gca tac ata | 480 |
| Arg Ile Phe Arg Glu Val Gly Pro Lys Asn Ser Tyr Ile Ala Tyr Ile | |
| 145 150 155 160 | |
| gaa gai cac agt ggc aat gga acc ttt gta aat aca gag ctt gta ggg | 528 |
| Glu Asp His Ser Gly Asn Gly Thr Phe Val Asn Thr Glu Leu Val Gly | |
| 165 170 175 | |
| aaa gga aaa cgc cgt cct ttg aat aac aat tct gaa att gca ctg tea | 576 |
| Lys Gly Lys Arg Arg Pro Leu Asn Asn Asn Ser Glu Ile Ala Leu Ser | |
| 180 185 190 | |
| cta agc aga aat aaa gtt ttt gtc ttt ttt gat ctg act gia gat gat | 624 |
| Leu Ser Arg Asn Lys Val Phe Val Phe Phe Asp Leu Thr Val Asp Asp | |
| 195 200 205 | |

| | |
|---|------|
| cag tca gtt tat cct aag gca tta aga gat gaa tac atc atg tca aaa | 672 |
| Gln Ser Val Tyr Pro Lys Ala Leu Arg Asp Glu Tyr Ile Met Ser Lys | |
| 210 215 220 | |
| act ctt gga agt ggi gcc igt gga gag gta aag ctg gct ttc gag agg | 720 |
| Thr Leu Gly Ser Gly Ala Cys Gly Glu Val Lys Leu Ala Phe Glu Arg | |
| 225 230 235 240 | |
| aaa aca tgi aag aaa gta gcc ata aag atc atc agc aaa agg aag tit | 768 |
| Lys Thr Cys Lys Lys Val Ala Ile Lys Ile Ile Ser Lys Arg Lys Phe | |
| 245 250 255 | |
| gct att ggi tca gca aga gag gca gac cca gct ctc aat gtt gaa aca | 816 |
| Ala Ile Gly Ser Ala Arg Glu Ala Asp Pro Ala Leu Asn Val Glu Thr | |
| 260 265 270 | |
| gaa ata gaa att ttg aaa aag cta aat cat cct tgc atc atc aag att | 864 |
| Glu Ile Glu Ile Leu Lys Lys Leu Asn His Pro Cys Ile Ile Lys Ile | |
| 275 280 285 | |
| aaa aac ttt ttt gat gca gaa gat tat tat att gtt ttg gaa ttg atg | 912 |
| Lys Asn Phe Phe Asp Ala Glu Asp Tyr Tyr Ile Val Leu Glu Leu Met | |
| 290 295 300 | |
| gaa ggg gga gag ctg ttt gac aaa gtg gtg ggg aat aaa cgc ctg aaa | 960 |
| Glu Gly Gly Glu Leu Phe Asp Lys Val Val Gly Asn Lys Arg Leu Lys | |
| 305 310 315 320 | |
| gaa gci acc tgc aag ctc tat ttt tac cag atg ctc ttg gct gtg cag | 1008 |
| Glu Ala Thr Cys Lys Leu Tyr Phe Tyr Gln Met Leu Leu Ala Val Gln | |
| 325 330 335 | |
| iac cti cai gaa aac ggt att ata cac cgt gac tta aag cca gag aat | 1056 |
| Tyr Leu His Glu Asn Gly Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn | |
| 340 345 350 | |

| | |
|---|------|
| gtt tta ctg tca tct caa gaa gag gac tgt ett ata aag att act gat | 1104 |
| Val Leu Leu Ser Ser Gln Glu Glu Asp Cys Leu Ile Lys Ile Thr Asp | |
| 355 360 365 | |
| ttt ggg cac tcc aag att ttg gga gag acc tct ctc atg aga acc tta | 1152 |
| Phe Gly His Ser Lys Ile Leu Gly Glu Thr Ser Leu Met Arg Thr Leu | |
| 370 375 380 | |
| tgt gga acc ccc acc tac ttg gcg cct gaa gtt ctt gtt tct gtt ggg | 1200 |
| Cys Gly Thr Pro Thr Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Val Ser Val Gly | |
| 385 390 395 400 | |
| act gct ggg tat aac cgt gci gtg gac tgc tgg agt tta gga gtt att | 1248 |
| Thr Ala Gly Tyr Asn Arg Ala Val Asp Cys Trp Ser Leu Gly Val Ile | |
| 405 410 415 | |
| ctt ttt atc tgc ctt agt ggg tat cca cct ttc tct gag cat agg act | 1296 |
| Leu Phe Ile Cys Leu Ser Gly Tyr Pro Pro Phe Ser Glu His Arg Thr | |
| 420 425 430 | |
| caa gtg tca ctg aag gat cag atc acc agt gga aaa tac aac ttc att | 1344 |
| Gln Val Ser Leu Lys Asp Gln Ile Thr Ser Gly Lys Tyr Asn Phe Ile | |
| 435 440 445 | |
| cct gaa gtc tgg gca gaa gtc tca gag aaa gct ctg gac ctt gtc aag | 1392 |
| Pro Glu Val Trp Ala Glu Val Ser Glu Lys Ala Leu Asp Leu Val Lys | |
| 450 455 460 | |
| aag itg itg gta gtg gat cca aag gca cgt tit acg aca gaa gaa gcc | 1440 |
| Lys Leu Leu Val Val Asp Pro Lys Ala Arg Phe Thr Thr Glu Glu Ala | |
| 465 470 475 480 | |
| tta aga cac ccg tgg ctt cag gat gaa gac aig aag aga aag tit caa | 1488 |
| Leu Arg His Pro Trp Leu Gln Asp Glu Asp Met Lys Arg Lys Phe Gln | |
| 485 490 495 | |

gat ctt ctg tct gag gaa aat gaa tcc aca gct cta ccc cag gtt cta 1536
 Asp Leu Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Thr Ala Leu Pro Gln Val Leu
 500 505 510

gcc cag cct tct act agt cga aag cgg ccc cgt gaa ggg gaa gcc gag 1584
 Ala Gln Pro Ser Thr Ser Arg Lys Arg Pro Arg Glu Gly Glu Ala Glu
 515 520 525

ggt gcc gag acc aca aag cgc cca gct gtg tgt gct gct gtg ttg 1629
 Gly Ala Glu Thr Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala Val Leu
 530 535 540

<210> 4
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Ser Arg Glu Ser Asp Val Glu Ala Gln Gln Ser His Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Cys Ser Gln Pro His Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Gly Ser Ser
 20 25 30

Ser Gln Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Met Pro Asn
 35 40 45

Ser Ser Gln Ser Ser His Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Glu
 50 55 60

Thr Val Ser Thr Gln Glu Leu Tyr Ser Ile Pro Glu Asp Gln Glu Pro
 65 70 75 80

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| Glu Asp Gln Glu Pro Glu Glu Pro Thr Pro Ala Pro Trp Ala Arg Leu | | | |
| | 85 | 90 | 95 |
| Trp Ala Leu Glu Asp Gly Phe Ala Asn Leu Glu Cys Val Asn Asp Asn | | | |
| | 100 | 105 | 110 |
| Tyr Trp Phe Gly Arg Asp Lys Ser Cys Glu Tyr Cys Phe Asp Glu Pro | | | |
| | 115 | 120 | 125 |
| Leu Leu Lys Arg Thr Asp Lys Tyr Arg Thr Tyr Ser Lys Lys His Phe | | | |
| | 130 | 135 | 140 |
| Arg Ile Phe Arg Glu Val Gly Pro Lys Asn Ser Tyr Ile Ala Tyr Ile | | | |
| | 145 | 150 | 155 |
| Glu Asp His Ser Gly Asn Gly Thr Phe Val Asn Thr Glu Leu Val Gly | | | |
| | 165 | 170 | 175 |
| Lys Gly Lys Arg Arg Pro Leu Asn Asn Asn Ser Glu Ile Ala Leu Ser | | | |
| | 180 | 185 | 190 |
| Leu Ser Arg Asn Lys Val Phe Val Phe Phe Asp Leu Thr Val Asp Asp | | | |
| | 195 | 200 | 205 |
| Gln Ser Val Tyr Pro Lys Ala Leu Arg Asp Glu Tyr Ile Met Ser Lys | | | |
| | 210 | 215 | 220 |
| Thr Leu Gly Ser Gly Ala Cys Gly Glu Val Lys Leu Ala Phe Glu Arg | | | |
| | 225 | 230 | 235 |
| Lys Thr Cys Lys Lys Val Ala Ile Lys Ile Ile Ser Lys Arg Lys Phe | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| Ala Ile Gly Ser Ala Arg Glu Ala Asp Pro Ala Leu Asn Val Glu Thr | | | |
| | 260 | 265 | 270 |

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| Glu Ile Glu Ile Leu Lys Lys Leu Asn His Pro Cys Ile Ile Lys Ile | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Lys Asn Phe Phe Asp Ala Glu Asp Tyr Tyr Ile Val Leu Glu Leu Met | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Glu Gly Gly Glu Leu Phe Asp Lys Val Val Gly Asn Lys Arg Leu Lys | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Glu Ala Thr Cys Lys Leu Tyr Phe Tyr Gln Met Leu Leu Ala Val Gln | | | |
| | 325 | 330 | 335 |
| Tyr Leu His Glu Asn Gly Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn | | | |
| | 340 | 345 | 350 |
| Val Leu Leu Ser Ser Glu Glu Glu Asp Cys Leu Ile Lys Ile Thr Asp | | | |
| | 355 | 360 | 365 |
| Phe Gly His Ser Lys Ile Leu Gly Glu Thr Ser Leu Met Arg Thr Leu | | | |
| | 370 | 375 | 380 |
| Cys Gly Thr Pro Thr Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Val Ser Val Gly | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Thr Ala Gly Tyr Asn Arg Ala Val Asp Cys Trp Ser Leu Gly Val Ile | | | |
| | 405 | 410 | 415 |
| Leu Phe Ile Cys Leu Ser Gly Tyr Pro Pro Phe Ser Glu His Arg Thr | | | |
| | 420 | 425 | 430 |
| Glu Val Ser Leu Lys Asp Gln Ile Thr Ser Gly Lys Tyr Asn Phe Ile | | | |
| | 435 | 440 | 445 |
| Pro Glu Val Trp Ala Glu Val Ser Glu Lys Ala Leu Asp Leu Val Lys | | | |
| 450 | 455 | 460 | |

Lys Leu Leu Val Val Asp Pro Lys Ala Arg Phe Thr Thr Glu Glu Ala
 465 470 475 480

Leu Arg His Pro Trp Leu Gln Asp Glu Asp Met Lys Arg Lys Phe Gln
 485 490 495

Asp Leu Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Thr Ala Leu Pro Gln Val Leu
 500 505 510

Ala Gln Pro Ser Thr Ser Arg Lys Arg Pro Arg Glu Gly Glu Ala Glu
 515 520 525

Gly Ala Glu Thr Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala Val Leu
 530 535 540

<210> 5
 <211> 1629
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1629)

<400> 5
 atg tct cgg gag tgg gat gtt gag gct cag cag tct cat ggc agc agt 48
 Met Ser Arg Glu Ser Asp Val Glu Ala Gln Gln Ser His Gly Ser Ser
 1 5 10 15

gcc tgt tca cag ccc cat ggc agc gtt acc cag tcc caa ggc tcc tcc 96
 Ala Cys Ser Gln Pro His Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Gly Ser Ser
 20 25 30

| | |
|---|-----|
| tea cag tcc cag ggc ata tcc agc icc ict acc agc acg atg cca aac | 144 |
| Ser Gln Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Met Pro Asn | |
| 35 40 45 | |
| tec agc cag tcc tet cac tcc agc ict ggg aca ctg agc tcc tta gag | 192 |
| Ser Ser Gln Ser Ser His Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Glu | |
| 50 55 60 | |
| aca gtg tcc act cag gaa ctc tai ict att cct gag gac caa gaa cct | 240 |
| Thr Val Ser Thr Gln Glu Leu Tyr Ser Ile Pro Glu Asp Gln Glu Pro | |
| 65 70 75 80 | |
| gag gac caa gaa cct gag gag cct acc cct gcc ccc tgg gct cga tta | 288 |
| Glu Asp Gln Glu Pro Glu Glu Pro Thr Pro Ala Pro Trp Ala Arg Leu | |
| 85 90 95 | |
| tgg gcc ctt cag gal gga ttt gcc aat ctt gaa tgt gtg aat gac aac | 336 |
| Trp Ala Leu Gln Asp Gly Phe Ala Asn Leu Glu Cys Val Asn Asp Asn | |
| 100 105 110 | |
| tac tgg ttt ggg agg gac aaa agc tgt gaa tat tgc ttt gal gaa cca | 384 |
| Tyr Trp Phe Gly Arg Asp Lys Ser Cys Glu Tyr Cys Phe Asp Glu Pro | |
| 115 120 125 | |
| ctg ctg aaa aga aca gat aaa tac cga aca tac agc aag aaa cac ttt | 432 |
| Leu Leu Lys Arg Thr Asp Lys Tyr Arg Thr Tyr Ser Lys Lys His Phe | |
| 130 135 140 | |
| cgg att ttc agg gaa gtg ggt cct aaa aac tct tac att gca tac ala | 480 |
| Arg Ile Phe Arg Glu Val Gly Pro Lys Asn Ser Tyr Ile Ala Tyr Ile | |
| 145 150 155 160 | |
| gaa gai cac agt ggc aat gga acc ttt gta aat aca gag ctt gta ggg | 528 |
| Glu Asp His Ser Gly Asn Gly Thr Phe Val Asn Thr Glu Leu Val Gly | |
| 165 170 175 | |

| | |
|---|-----|
| aaa gga aaa cgc cgt cct ttg aat aac aat tct gaa att gca ctg tca | 576 |
| Lys Gly Lys Arg Arg Pro Leu Asn Asn Asn Ser Glu Ile Ala Leu Ser | |
| 180 185 190 | |
| cta agc aga aat aaa gtt itt gtc itt itt gat ctg act gta gat gat | 624 |
| Leu Ser Arg Asn Lys Val Phe Val Phe Phe Asp Leu Thr Val Asp Asp | |
| 195 200 205 | |
| cag tca gtt tat cct aag gca tta aga gat gaa tac atc atg tca aaa | 672 |
| Gln Ser Val Tyr Pro Lys Ala Leu Arg Asp Glu Tyr Ile Met Ser Lys | |
| 210 215 220 | |
| act ctt gga agt ggt gcc tgt gga gag gta aag ctg gct ttc gag agg | 720 |
| Thr Leu Gly Ser Gly Ala Cys Gly Glu Val Lys Leu Ala Phe Glu Arg | |
| 225 230 235 240 | |
| aaa aca tgt aag aaa gta gcc ata aag atc atc agc aaa agg aag ttt | 768 |
| Lys Thr Cys Lys Lys Val Ala Ile Lys Ile Ile Ser Lys Arg Lys Phe | |
| 245 250 255 | |
| gct att ggt tca gca aga gag gca gac cca gct ctc aat gtt gaa aca | 816 |
| Ala Ile Gly Ser Ala Arg Glu Ala Asp Pro Ala Leu Asn Val Glu Thr | |
| 260 265 270 | |
| gaa ata gaa att itg aaa aag cta aat cat cct tgc atc atc aag att | 864 |
| Glu Ile Glu Ile Leu Lys Lys Leu Asn His Pro Cys Ile Ile Lys Ile | |
| 275 280 285 | |
| aaa aac itt itt gat gca gaa gat tat tat att gtt ttg gaa ttg atg | 912 |
| Lys Asn Phe Phe Asp Ala Glu Asp Tyr Tyr Ile Val Leu Glu Leu Met | |
| 290 295 300 | |
| gaa ggg gga gag ctg ttt gac aaa gtg gtg ggg aat aaa cgc ctg aaa | 960 |
| Glu Gly Gly Glu Leu Phe Asp Lys Val Val Gly Asn Lys Arg Leu Lys | |
| 305 310 315 320 | |

| | |
|---|------|
| gaa gct acc tgc aag ctc iat tti tac cag atg ctc ttg gct gtg cag | 1008 |
| Glu Ala Thr Cys Lys Leu Tyr Phe Tyr Gln Met Leu Leu Ala Val Gln | |
| 325 330 335 | |
| tac ctt cai gaa aac ggt att ata cac cgt gac tta aag cca gag aat | 1056 |
| Tyr Leu His Glu Asn Gly Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn | |
| 340 345 350 | |
| gtt tta ctg tca tci caa gaa gag gac tgt ctt ata aag att act gaa | 1104 |
| Val Leu Leu Ser Ser Gln Glu Glu Asp Cys Leu Ile Lys Ile Thr Glu | |
| 355 360 365 | |
| ttt ggg cac tcc aag att ttg gga gag acc tct ctc atg aga acc tta | 1152 |
| Phe Gly His Ser Lys Ile Leu Gly Glu Thr Ser Leu Met Arg Thr Leu | |
| 370 375 380 | |
| tgt gga acc ccc acc tac ttg gcg cct gaa gtt ctt gtt tct gtt ggg | 1200 |
| Cys Gly Thr Pro Thr Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Val Ser Val Gly | |
| 385 390 395 400 | |
| act gct ggg iat aac cgt gct gtg gac tgc tgg agt tta gga gtt att | 1248 |
| Thr Ala Gly Tyr Asn Arg Ala Val Asp Cys Trp Ser Leu Gly Val Ile | |
| 405 410 415 | |
| ctt tti atc tgc ctt agt ggg tat cca cct ttc tct gag cat agg act | 1296 |
| Leu Phe Ile Cys Leu Ser Gly Tyr Pro Pro Phe Ser Glu His Arg Thr | |
| 420 425 430 | |
| caa gtg tca ctg aag gat cag atc acc agt gga aaa tac aac ttc att | 1344 |
| Gln Val Ser Leu Lys Asp Gln Ile Thr Ser Gly Lys Tyr Asn Phe Ile | |
| 435 440 445 | |
| cct gaa gtc tgg gca gaa gtc tca gag aaa gct ctg gac ctt gtc aag | 1392 |
| Pro Glu Val Trp Ala Glu Val Ser Glu Lys Ala Leu Asp Leu Val Lys | |
| 450 455 460 | |

aag ttg ttg gta gtg gat cca aag gca cgt tti acg aca gaa gaa gcc 1440
 Lys Leu Leu Val Val Asp Pro Lys Ala Arg Phe Thr Thr Glu Glu Ala
 465 470 475 480

tta aga cac ccg tgg ctt cag gat gaa gac atg aag aga aag ttt caa 1488
 Leu Arg His Pro Trp Leu Gln Asp Glu Asp Met Lys Arg Lys Phe Gln
 485 490 495

gat ctt ctg tct gag gaa aat gaa tcc aca gct cta ccc cag gtt cta 1536
 Asp Leu Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Thr Ala Leu Pro Gln Val Leu
 500 505 510

gcc cag cct tct act agt cga aag cgg ccc cgt gaa ggg gaa gcc gag 1584
 Ala Gln Pro Ser Thr Ser Arg Lys Arg Pro Arg Glu Gly Glu Ala Glu
 515 520 525

ggt gcc gag acc aca aag cgc cca gct gtg tgt gct gct gtg ttg 1629
 Gly Ala Glu Thr Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala Val Leu
 530 535 540

<210> 6
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Ser Arg Glu Ser Asp Val Glu Ala Gln Gln Ser His Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Ala Cys Ser Gln Pro His Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Gly Ser Ser
 20 25 30

Ser Gln Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Met Pro Asn
 35 40 45

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Ser | Gln | Ser | Ser | His | Ser | Ser | Ser | Gly | Thr | Leu | Ser | Ser | Leu | Glu |
| 50 | | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Thr | Val | Ser | Thr | Gln | Glu | Leu | Tyr | Ser | Ile | Pro | Glu | Asp | Gln | Glu | Pro |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| Glu | Asp | Gln | Glu | Pro | Glu | Glu | Pro | Thr | Pro | Ala | Pro | Trp | Ala | Arg | Leu |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Trp | Ala | Leu | Gln | Asp | Gly | Phe | Ala | Asn | Leu | Glu | Cys | Val | Asn | Asp | Asn |
| | | 100 | | | | | | 105 | | | | | | 110 | |
| Tyr | Trp | Phe | Gly | Arg | Asp | Lys | Ser | Cys | Glu | Tyr | Cys | Phe | Asp | Glu | Pro |
| | | 115 | | | | | | 120 | | | | | 125 | | |
| Leu | Leu | Lys | Arg | Thr | Asp | Lys | Tyr | Arg | Thr | Tyr | Ser | Lys | Lys | His | Phe |
| | | 130 | | | | | | 135 | | | | | | 140 | |
| Arg | Ile | Phe | Arg | Glu | Val | Gly | Pro | Lys | Asn | Ser | Tyr | Ile | Ala | Tyr | Ile |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Glu | Asp | His | Ser | Gly | Asn | Gly | Thr | Phe | Val | Asn | Thr | Glu | Leu | Val | Gly |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Lys | Gly | Lys | Arg | Arg | Pro | Leu | Asn | Asn | Asn | Ser | Glu | Ile | Ala | Leu | Ser |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | |
| Leu | Ser | Arg | Asn | Lys | Val | Phe | Val | Phe | Phe | Asp | Leu | Thr | Val | Asp | Asp |
| | | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | |
| Gln | Ser | Val | Tyr | Pro | Lys | Ala | Leu | Arg | Asp | Glu | Tyr | Ile | Met | Ser | Lys |
| | | | | 210 | | | | 215 | | | | | 220 | | |
| Thr | Leu | Gly | Ser | Gly | Ala | Cys | Gly | Glu | Val | Lys | Leu | Ala | Phe | Glu | Arg |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |

Lys Thr Cys Lys Lys Val Ala Ile Lys Ile Ile Ser Lys Arg Lys Phe
 245 250 255
 Ala Ile Gly Ser Ala Arg Glu Ala Asp Pro Ala Leu Asn Val Glu Thr
 260 265 270
 Glu Ile Glu Ile Leu Lys Lys Leu Asn His Pro Cys Ile Ile Lys Ile
 275 280 285
 Lys Asn Phe Phe Asp Ala Glu Asp Tyr Tyr Ile Val Leu Glu Leu Met
 290 295 300
 Glu Gly Gly Glu Leu Phe Asp Lys Val Val Gly Asn Lys Arg Leu Lys
 305 310 315 320
 Glu Ala Thr Cys Lys Leu Tyr Phe Tyr Gln Met Leu Leu Ala Val Gln
 325 330 335
 Tyr Leu His Glu Asn Gly Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn
 340 345 350
 Val Leu Leu Ser Ser Gln Glu Glu Asp Cys Leu Ile Lys Ile Thr Glu
 355 360 365
 Phe Gly His Ser Lys Ile Leu Gly Glu Thr Ser Leu Met Arg Thr Leu
 370 375 380
 Cys Gly Thr Pro Thr Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Val Ser Val Gly
 385 390 395 400
 Thr Ala Gly Tyr Asn Arg Ala Val Asp Cys Trp Ser Leu Gly Val Ile
 405 410 415
 Leu Phe Ile Cys Leu Ser Gly Tyr Pro Pro Phe Ser Glu His Arg Thr
 420 425 430

Gln Val Ser Leu Lys Asp Gln Ile Thr Ser Gly Lys Tyr Asn Phe Ile
 435 440 445

Pro Glu Val Trp Ala Glu Val Ser Glu Lys Ala Leu Asp Leu Val Lys
 450 455 460

Lys Leu Leu Val Val Asp Pro Lys Ala Arg Phe Thr Thr Glu Glu Ala
 465 470 475 480

Leu Arg His Pro Trp Leu Gln Asp Glu Asp Met Lys Arg Lys Phe Gln
 485 490 495

Asp Leu Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Thr Ala Leu Pro Gln Val Leu
 500 505 510

Ala Gln Pro Ser Thr Ser Arg Lys Arg Pro Arg Glu Gly Glu Ala Glu
 515 520 525

Gly Ala Glu Thr Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala Val Leu
 530 535 540

<210> 7
 <211> 303
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(303)

<400> 7
 ggc agi ccc att act act gtt cca aaa ttg gat aaa aat cca aac cia 48
 Gly Ser Pro Ile Thr Thr Val Pro Lys Leu Asp Lys Asn Pro Asn Leu
 1 5 10 15

gga gaa gac cag gca gaa gag att tca gat gaa tta atg gag ttt tcc 96
 Gly Glu Asp Gln Ala Glu Glu Ile Ser Asp Glu Leu Met Glu Phe Ser
 20 25 30

ctg aaa gat caa gaa gca aag gtg agc aga agt ggc cta tat cgc tcc 144
 Leu Lys Asp Gln Glu Ala Lys Val Ser Arg Ser Gly Leu Tyr Arg Ser
 35 40 45

cgg tgg atg cca gag aac ttg aac agg cca aga ctg aag cag gtg gaa 192
 Pro Ser Met Pro Glu Asn Leu Asn Arg Pro Arg Leu Lys Gln Val Glu
 50 55 60

aaa ttc aag gac aac aca ata cca gat aaa gtt aaa aaa aag tat ttt 240
 Lys Phe Lys Asp Asn Thr Ile Pro Asp Lys Val Lys Lys Lys Tyr Phe
 65 70 75 80

tct ggc caa gga aag ctg agg aag ggc tta tgt tta aag aag aca gtc 288
 Ser Gly Gln Gly Lys Leu Arg Lys Gly Leu Cys Leu Lys Lys Thr Val
 85 90 95

tcg ctg tgt gac att 303
 Ser Leu Cys Asp Ile
 100

<210> 8

<211> 101

<212> PRT.

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Ser Pro Ile Thr Thr Val Pro Lys Leu Asp Lys Asn Pro Asn Leu
 1 5 10 15

Gly Glu Asp Gln Ala Glu Glu Ile Ser Asp Glu Leu Met Glu Phe Ser
 20 25 30

Leu Lys Asp Gln Glu Ala Lys Val Ser Arg Ser Gly Leu Tyr Arg Ser
35 40 45
Pro Ser Met Pro Glu Asn Leu Asn Arg Pro Arg Leu Lys Gln Val Glu
50 55 60
Lys Phe Lys Asp Asn Thr Ile Pro Asp Lys Val Lys Lys Lys Tyr Phe
65 70 75 80
Ser Gly Gln Gly Lys Leu Arg Lys Gly Leu Cys Leu Lys Lys Thr Val
85 90 95
Ser Leu Cys Asp Ile
100

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9
catgaaitca tgtctcggga gtcggatgtt 30

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 10

catctcgagc aacacagcag cacacacagc

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

tgtcttataa agattaciga atttgggcac

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 12

aatcttggag tgcccaatt cagtaatctt

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 GST-Chk2 (del; 337-365) が GST-Chk2 のリン酸化酵素活性を阻害することを示すオートラジオグラフィーの結果を示す写真である。

【図2】 Chk2 (del; 337-365) がインビボで Chk2 リン酸化酵素活性を阻害することを示すオートラジオグラフィーの結果を示す写真である。

【 図 1 】

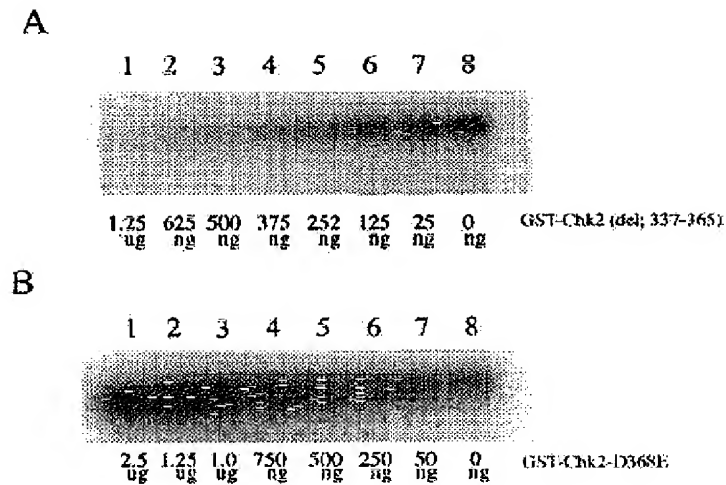


図 1 GST-Chk2-wt のタンパク質リン酸化酵素活性は GST-Chk2 (del ; 337-365) により阻害されたが、GST-Chk2-D368E によつては阻害されなかった。

1 反応あたり 250 ng の GST-Chk2-wt を GST-Chk2 (del ; 337-365) (A) 若しくは GST-Chk2-D368E (B) の存在下 (レーン 1~7) または非存在下 (レーン 8) に 30℃ で 30 分間インキュベーションした。それぞれの反応はそれぞれのレーンに対して独立に行われた。自己リン酸化部位への ^{32}P の取り込みは、SDS-PAGE に続くオートラジオグラフィーにより検出された。それぞれの反応に対して添加された GST-Chk2 (del ; 337-365) および GST-Chk2-D368E の量は、それぞれ A および B に示してある。自己リン酸化は、GST-Chk2 (del ; 337-365) 添加の場合に減少したが、GST-Chk2-D368E では減少しなかった。

(51)Int.Cl.⁷

C 1 2 N 1/19
1/21
5/10
G 0 1 N 33/15

識別記号

F I

G 0 1 N 33/15
33/50
33/566
C 1 2 P 21/02

(参考)

Z 4 H 0 4 5
Z
C

【図2】

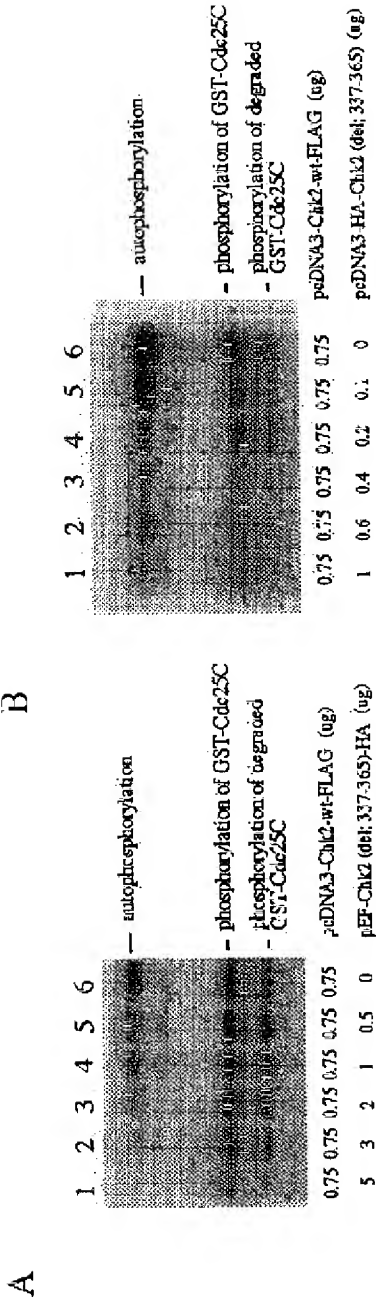


図2 Chk2 (del; 337-365) は in vivo で Chk2-wt のタンパク質リン酸化酵素活性を阻害する。

pDNA3-Chk2-wt-FLAGをpEF-Chk2 (del; 337-365)-HA (A) またはpDNA3-HA-Chk2 (del; 337-365) (B) と同時に (レーン1~5)、または単独で (レーン6) トランスフェクトした。トランスフェクションに用いたプラスミドDNAの量は、それぞれのパネルに示されている。ただし、DNAの導入効率が一定となるよう、インサートを含まないpEF-HA (A) またはpCND A-HA (B) を加えることで各トランスフェクタント間でトランスフェクションに使用されるDNAの総量を補正した。293T細胞で一時的に発現されるFLAGタグ付きChk2-wtは、抗FLAGモノクローナル抗体で免疫沈降され、リン酸化酵素アッセイに用いられた。自己リン酸化部位およびGST-Cdc25C (167-267) 基質への³²Pの取り込みはChk2 (del; 337-365) が増加するとともに減少した。

| | | |
|------------------|-----------------|---------|
| 33/50 | (C 1 2 N 1/21 | |
| 33/566 | C 1 2 R 1:19) | |
| // C 1 2 P 21/02 | (C 1 2 P 21/02 | C |
| (C 1 2 N 1/21 | C 1 2 R 1:19) | |
| C 1 2 R 1:19) | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| (C 1 2 P 21/02 | A 6 1 K 37/64 | |
| C 1 2 R 1:19) | C 1 2 N 5/00 | A |

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB16 BB20 DA13
DA36 FB01 FB02
4B024 AA01 BA80 CA04 DA06 EA04
GA11 HA01
4B064 AG01 AG21 CA02 CA19 CC24
DA01
4B065 AA26X AA93Y AA99Y AB01
BA02 CA24 CA44
4C084 AA01 AA07 BA01 CA53 NA14
ZB262 ZC202
4H045 AA10 BA10 CA40 DA55 EA20
EA28 FA74